

31 Dec

Rec'd PCT 14 OCT 2003

10/511098

PCT/JP 03/08020

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

13.08.03

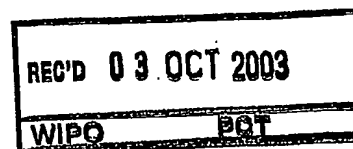
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 6月25日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-185020
[ST. 10/C]: [JP2002-185020]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所
積水化学工業株式会社

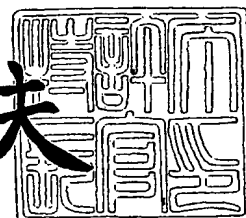


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



BEST AVAILABLE COPY

山 証 第 1 号 山 証 第 2002-3076044

【書類名】 特許願

【整理番号】 02P00846

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/79

【発明者】

【住所又は居所】 岩手県釜石市平田第 3 地割 7 5 - 1 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所内

【氏名】 井手野 晃

【発明者】

【住所又は居所】 岩手県釜石市平田第 3 地割 7 5 - 1 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所内

【氏名】 丸山 正

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社内

【氏名】 古谷 昌弘

【特許出願人】

【識別番号】 591001949

【氏名又は名称】 株式会社海洋バイオテクノロジー研究所

【特許出願人】

【識別番号】 000002174

【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

【代理人】

【識別番号】 100086586

【弁理士】

【氏名又は名称】 安富 康男

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 033891

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 発現ベクター、宿主、融合タンパク質、タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 第 2 コード領域を組み込んで発現させることにより、第 1 コード領域にコードされるタンパク質と第 2 コード領域にコードされるタンパク質との融合タンパク質が得られる発現ベクターであって、

(a) 分子シャペロン活性を有するポリペプチドをコードし、プロモーターに有効に連結する第 1 コード領域、

(b) 前記第 1 コード領域と同じ解読枠内であって、前記第 1 コード領域の下流にあり、前記第 2 コード領域を挿入することができる少なくとも 1 つの制限酵素サイトを有する領域、及び、

(c) 前記第 1 コード領域と前記第 2 コード領域を挿入することができる少なくとも 1 つの制限酵素サイトを有する領域との間にあり、同じ解読枠内で翻訳されてプロテアーゼ消化アミノ酸配列となる領域からなることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 2】 請求項 1 記載の発現ベクターに第 2 コード領域を組み込んでなることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 3】 分子シャペロン活性を有するポリペプチドは、分子シャペロン活性を有する P P I a s e であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の発現ベクター。

【請求項 4】 分子シャペロン活性を有する P P I a s e は、古細菌由来 F K B P 型 P P I a s e であることを特徴とする請求項 3 記載の発現ベクター。

【請求項 5】 古細菌由来 F K B P 型 P P I a s e は、ショートタイプ F K B P 型 P P I a s e であることを特徴とする請求項 4 記載の発現ベクター。

【請求項 6】 分子シャペロン活性を有する P P I a s e は、トリガーファクタータイプ P P I a s e、F k p A タイプ P P I a s e、S u r A タイプ P P I a s e、F K B P 5 2 タイプ P P I a s e、又は、C y P 4 0 タイプ P P I a s e であることを特徴とする請求項 3 記載の発現ベクター。

【請求項 7】 第 2 コード領域は、モノクローナル抗体をコードする領域であることを特徴とする請求項 2、3、4、5 又は 6 記載の発現ベクター。

【請求項 8】 請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載の発現ベクターを内包することを特徴とする宿主。

【請求項 9】 大腸菌であることを特徴とする請求項 8 記載の宿主。

【請求項 10】 分子シャペロン活性を有するポリペプチドと第 2 コード領域がコードするタンパク質とが融合している融合タンパク質であって、前記分子シャペロン活性を有するポリペプチドと前記第 2 コード領域がコードするタンパク質との間にプロテアーゼ消化アミノ酸配列を有することを特徴とする融合タンパク質。

【請求項 11】 第 2 コード領域がコードするタンパク質であって、請求項 10 記載の融合タンパク質をプロテアーゼ消化アミノ酸配列を消化するプロテアーゼで消化して得られることを特徴とするタンパク質。

【請求項 12】 分子シャペロン活性を有するポリペプチドと第 2 コード領域がコードするタンパク質とが融合している融合タンパク質を製造する方法であって、請求項 2、3、4、5、6 又は 7 記載の発現ベクターを内包する宿主を、前記発現ベクターの発現条件下で培養することを特徴とする融合タンパク質の製造方法。

【請求項 13】 第 2 コード領域がコードするタンパク質の製造方法であって、請求項 2、3、4、5、6 又は 7 記載の発現ベクターを内包する宿主を、前記発現ベクターの発現条件下で培養し、得られた融合タンパク質をプロテアーゼ消化アミノ酸配列を消化するプロテアーゼで消化することを特徴とするタンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、組み換えタンパク質が封入体等の異常型として発現することを防ぎ、天然型として可溶画分に生産することができる、発現ベクター、宿主、融合タンパク質、タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法に関

する。

【0002】

【従来の技術】

近年、種々の生物のゲノム解析が終了しつつあり、今後は遺伝子の発現産物であるタンパク質の網羅的な機能解析へと進むと考えられている。個々のタンパク質の性質を明らかにするとともに、タンパク質同士の相互作用を網羅的に解析することで、生命現象解明の一助としようとする研究が急速に増えつつある。一方、各種の生理活性物質と特異的に結合し、その作用を伝達する細胞内受容体タンパク質も、その受容体タンパク質と結合する活性物質が、新規医薬品の候補物質となり得ることから、その3次元構造決定に重大な関心が持たれ、新規医薬品のスクリーニングにおいて注目されている。このようなタンパク質の性質を決定しようとする場合、該当する遺伝子をベクター遺伝子上に組み込み、バクテリア、酵母、昆虫細胞等の宿主にトランスフォーメーションし、発現させて得られる組み換えタンパク質の性質を調べる方法が一般的である。

【0003】

タンパク質の正しい性質を評価する際、そのタンパク質が、正しい立体構造に折り畳まれているか否かが非常に重要となる。しかしながら、異種生物由来のタンパク質を、上述の宿主発現系を用いたタンパク質発現法で作成しようとする場合、しばしばタンパク質のフォールディング異常により、立体構造の異なった異常型タンパク質しか得られないケースに遭遇する。このようなタンパク質は宿主内で封入体と呼ばれる凝集体として発現したり、宿主細胞のプロテアーゼにより、分解されたりすることが知られている。これらを解決するためには、目的タンパク質の宿主細胞内での折り畳み反応が正確に行われるよう制御することが極めて重要であると考えられる。

【0004】

目的タンパク質が異常型タンパク質である封入体として発現した場合、その正常型を得る手段としては、従来それをインビトロで正常型に変換する方法が一般的であった。即ち、宿主から封入体を回収し、高濃度の塩酸グアニジンや尿素等で可溶化後、適当な緩衝液等で30～100倍程度に希釈することで、可溶化した

目的タンパク質をリフォールディングさせる方法である。一例を挙げると、抗体は、医療分野等での利用が期待されているが、その組み換え体が大腸菌を宿主としてその細胞質内に発現しようとする、ほとんどが不溶性の封入体として発現されることが知られている (Pluckthun, Biotechnology、9、545-、1991年)。封入体として得られた抗体を、効率よくインビトロでリフォールディングする方法として、希釈緩衝液中にタンパク質の折り畳みを促進するシャペロニンを含むことで、その収量を増大させる方法が提案されている (特開平9-220092号)。抗体以外にも、封入体タンパク質として発現するNGF/BDNFファミリータンパク質のリフォールディング方法 (特開平6-327489号、特開平6-319549号) や、ニューロトロフィン-3のリフォールディング方法 (特開平9-262093号) 等、希釈液中に還元剤、有機酸等を加えることで、目的タンパク質の収量を増大させる、さまざまな工夫が提案されてきた。しかしながら、封入体として得られたタンパク質をインビトロでリフォールディングさせるこれらの方法は、非常に手間がかかる割には、得られる収量は低い。

【0005】

抗体の場合、そのN末端にシグナル配列を付与してペリプラズム領域に発現させれば、大腸菌を宿主として用いても可溶画分に発現できることが報告されている (Glockshuber, Biochemistry 31、1279-、1992年)。しかしながら、ペリプラズム領域は細胞質領域と比較して、非常に狭い領域であるため、タンパク質が発現される量も非常に少なく、たとえ、発現量が増やせたとしても、封入体になってしまう。細胞質内に抗体を可溶体として発現させようとする試みもいくつか報告されている。タンパク質のフォールディングに参与する分子シャペロンと抗体遺伝子を細胞質内で共発現させることで、組み換え抗体の封入体形成を防ぎ、可溶型の収量を増大させる工夫や、宿主大腸菌としてチオレドキシン還元酵素欠損株を用いる方法等が提案されている (特開平9-220092号; Ploba, Gene 159、203-、1995年)。しかしながら、これらの方法は、可溶型の抗体を得ることができるとはいえ、その収量は1mg/培地1L程度と低く (Levy, Protein Exp

ression and Purification 23、338一、2001年)、更に生産効率の良い方法が必要とされている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記現状に鑑み、組み換えタンパク質生産時の不活性な異常型タンパク質の形成を防ぎ、目的タンパク質を天然型、即ち、可溶型として大量且つ効率的に生産させることを可能とする、発現ベクター、宿主、融合タンパク質、タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明は、第2コード領域を組み込んで発現させることにより、第1コード領域にコードされるタンパク質と第2コード領域にコードされるタンパク質との融合タンパク質が得られる発現ベクターであって、(a) 分子シャペロン活性を有するポリペプチドをコードし、プロモーターに有効に連結する第1コード領域、(b) 前記第1コード領域と同じ読読枠内であって、前記第1コード領域の下流にあり、前記第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域、及び、(c) 前記第1コード領域と前記第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域との間にあり、同じ読読枠内で翻訳されてプロテアーゼ消化アミノ酸配列となる領域からなる発現ベクターである。

なお、本発明において「プロモーターに有効に連結する」とは、分子シャペロン活性を有するポリペプチドが正常に転写されるように第1コード領域がプロモーターに連結していることを意味する。

以下に本発明を詳述する。

【0008】

本発明の発現ベクターは、目的タンパク質である第2コード領域がコードするタンパク質を第1コード領域がコードする分子シャペロン活性を有するポリペプチドとの融合タンパク質として発現するものであり、第1コード領域、第2コード

領域を挿入するための少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域、及び、プロテアーゼ消化アミノ酸配列となる領域からなるものである。

【0009】

上記第1コード領域は、分子シャペロン活性を有するポリペプチドをコードし、プロモーターに有効に連結するものである。

上記分子シャペロン活性とは、変性したタンパク質を元の天然型にリフォールディングさせる活性、又は、変性したタンパク質の不可逆的な凝集を抑制する活性を意味する。例えば、ロダネーゼ、クエン酸合成酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等をモデル酵素とし（河田、バイオサイエンスとインダストリー 56, 593-、1998年）、これらを6M塩酸グアニジン等のタンパク質変性剤で変性処理後、検定対象物質を含む緩衝液で変性剤を希釈した際に開始する変性タンパク質の再生率や、変性タンパク質の凝集の抑制率でその検定対象物の分子シャペロン活性を評価することができる。なお、変性タンパク質の再生率を評価する方法としては、例えばロダネーゼの場合、ホロビッチらの方法（Horowitz, Methods Mol. Biol. 40, 361-、1995年）が挙げられ、変性タンパク質の凝集抑制を評価する方法としては田口らの方法（Taguchi, J. Biol. Chem. 269, 8529-、1994年）等が挙げられる。

【0010】

上記分子シャペロン活性を有するポリペプチドとしては特に限定されず、例えば、古細菌由来FKBP型PPase等の分子シャペロン活性を有するPPase；スモールヒートショックプロテイン、シャペロニン、プレフォルディン、DnaK、DnaJ、GrpE、HSP90等が挙げられる。なかでも、分子シャペロン活性を有するPPaseが好ましい。

【0011】

上記スモールヒートショックプロテインは、15～30kDa程度のサブユニットが、24～32程度集まって巨大な分子構造をとり、シャペロン活性を有することが報告されている（Jakob, J. Biol. Chem. 268, 1517-、1993年）。これと相同性の高い領域をそのC末端領域に有するクリ

スタリンもまた、スモールヒートショックタンパク質と同様の性質を有しており、いずれも本発明の発現ベクターに適用可能である。

【0012】

上記シャペロニン¹は7～9個のサブユニットが環状に連なったドーナツ型構造が2段に重なった、合計14～18サブユニットからなる特徴的な構造を有している。シャペロニンは、ドーナツ構造の凹部に変性タンパク質を捕捉し、ATP等のヌクレオチドの消費をともなってタンパク質のリフォールディングを促進する。真正細菌由来のグループ1型シャペロニンの場合は、更に補助因子としてGroES（ヒートショックプロテイン10）の結合を伴って、タンパク質の折り畳み反応を促進する。真核生物または古細菌由来のグループ2型に属するシャペロニンの場合は、GroESのような補助因子は必要とせず、効率的に正しい立体構造のタンパク質へと折り畳むことが知られている（Gupta、Mol. Microbiol. 15、1-、1995年）。

【0013】

上記プレフォルディン²は真核生物のチューブリンのタンパク質折り畳みに関与する因子として見いだされた分子シャペロンであり（Lopez、J. Struct. Biol. 135、219-、2001年）、6両体を形成し、インビトロでは、変性したタンパク質と相互作用するシャペロン活性を有することが知られている（Sieger、Cell 103、621-、2000年）。

【0014】

上記DnaK、DnaJ及びGrpEのホモログは生物種を問わず幅広く存在し、タンパク質のフォールディングに関与していると考えられている分子シャペロンである。これらのうち、特に大腸菌のDnaK/DnaJ/GrpE系のタンパク質フォールディングシステムはよく研究されている。これらの提案されている反応メカニズムとしては、リボゾームで生合成された新生ポリペプチドがDnaKと結合し、ATP存在下でさらにDnaJが結合することで、不可逆的な凝集形成が抑制される。さらにGrpEに依存したヌクレオチドの解離に伴い、新生ポリペプチドも解離され、シャペロニンのフォールディングシステムに受け渡されるというものである（Fink、Molecular chaperon

es in the life cycle of proteins、MARCEL DEKKER, INC、1998)。本発明の発現ベクターにおいて、これら大腸菌由来のDnaK、DnaJ及びGrpEと同じ働するホモログであれば使用可能である。

【0015】

上記HSP90（ヒートショックプロテイン90）もまた、シャペロン様活性を有するものがあり（Ramsey、J. Biol. Chem. 275, 17857-、2000年）、そのホモログ、その一部またはそれらを含むポリペプチドであれば本発明の発現ベクターで用いることができる。

【0016】

上記PPIase（Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase）は、タンパク質のフォールディングに關与するタンパク質折り畳み因子の1つであり、細胞内でフォールディング途上のターゲットタンパク質中のアミノ酸のうち、プロリン残基のN末端側ペプチド結合のシストランス異性化反応を触媒する活性（PPIase活性）を有するものである。

【0017】

上記分子シャペロン活性を有するPPIaseはその阻害剤に対する感受性から、FK506 Binding Protein型（FKBP型）、シクロフィリン型及びパーブリン型の3種類に分類される。FKBP型PPIaseは免疫阻害剤の1つであるFK506により活性が阻害されるPPIase及びそのホモログである。シクロフィリン型PPIaseは、別の免疫阻害剤であるシクロスポリンに対して感受性を持つPPIase又はそのホモログである。一方、パーブリン型PPIaseは、いずれの免疫阻害剤に対しても感受性を示さず、jugloneによりその活性が阻害されるものである。この3種類のPPIaseは、アミノ酸一次配列上の相同性はほとんどない。

【0018】

本発明における分子シャペロン活性を有するPPIaseとしては特に限定されず、上記の3種類のPPIaseのうち、いずれのタイプのPPIaseであってもよく、例えば、古細菌由来FKBP型PPIase、トリガーファクタータ

イプPPIase (Huang, Protein Sci. 9、1254-、2000年)、FkpAタイプPPIase (Arie, Mol. Microbiol. 39、199-、2001年)、SurAタイプPPIase (Behrens, EMBO J. 20、285-、2001年)、FKBP52タイプPPIase (Bose, Science 274、1715-、1996年)、Cyp40タイプPPIase等が挙げられる (Pirkkl, J. Mol. Biol. 308、795-、2001年)。なお、本発明において、これらのPPIaseには、実質的に同等のポリペプチド、少なくともこれらの一部分を含むポリペプチド、及び、一部のアミノ酸を他のアミノ酸に改変したもの等も含まれる。

【0019】

上記古細菌由来FKBP型PPIaseの機能については、興味深いことに、PPIase活性だけでなく、タンパク質の不可逆的凝集を抑制すると同時に、変性タンパク質のリフォールディングを促進させる分子シャペロン活性を有することが見出されている (Furutani, Biochemistry 39、453-、2000年; Ideno, Eur. J. Biochem. 267、3139-、2000年; Ideno, Biochem. J. 357、465-、2001年; Ideno, Appl. Env. Microbiol. 68、464-、2002)。分子シャペロン活性は、本来、分子シャペロンの1つとして知られるシャペロニンやDnaK/DnaJ/GrpE系のタンパク質折り畳みシステムに見いだされた活性である。これらは、細胞内で生合成されたポリペプチドが正しい形に折り畳まれるよう、サポートする機能を果たしている。その際、ATP等の高エネルギー物質の加水分解を必要とする。古細菌由来FKBP型PPIaseは、その分子シャペロン活性を発揮する際、上記高エネルギー物質の加水分解反応を必要としない点で優れている。

【0020】

上記古細菌由来FKBP型PPIaseは、その分子量の違いにより、2種類に大別できる。一方は分子量が16~18kDa程度のショートタイプであり、他方は26~33kDa程度のロングタイプである。本発明におけるPPIase

は、ショートタイプ、ロングタイプのいずれの古細菌由来FKBP型PPIaseであってもよい。しかしながら、一般的に、ショートタイプの方がより強い分子シャペロン活性を有する傾向にあること、タンパク質の分子量が大きくなるにつれて、その組み換えタンパク質の発現量が低下する傾向があること、の2点を考慮すると、本発明ではショートタイプの古細菌由来FKBP型PPIaseの方が好ましい。なお、上記した分子量の幅はこれまで見いだされているPPIaseの分子量幅であり、本発明における古細菌由来FKBP型PPIaseは、この分子量幅に限定されず、実質的に同じグループに属するものであればいずれであってもよい。

【0021】

本発明における古細菌由来FKBP型PPIaseとしては特に限定されず、いずれの古細菌由来のものであってもよく、例えば、これまで見いだされている古細菌由来FKBP型PPIaseのうち、ショートタイプとしては、*Methanococcus thermolithotrophicus*由来、*Thermococcus* sp. KS-1由来、*Methanococcus jannaschii*由来のもの等が挙げられる (Maruyama、Front. Biosci 5、821-、2000)。一方、ロングタイプは、ゲノム解析やその他の解析の結果、ほとんどの古細菌のゲノム上で見いだされており、例えば、*Pyrococcus horikoshii*由来、*Aeropyrum pernix*由来、*Sulfolobus solfataricus*由来、*Methanococcus jannaschii*由来、*Archaeoglobus fulgidus*由来、*Methanobacterium autotrophicum*、*Thermoplasma acidophilum*由来、*Halobacterium cutirubrum*由来のもの等が挙げられる (Maruyama、Front. Biosci 5、821-、2000年)。ロングタイプFKBP型PPIaseの一例として、*Pyrococcus horikoshii*由来のアミノ酸配列を配列番号1に、ショートタイプFKBP型PPIaseの一例として、*Methanococcus jannaschii*由来のアミノ酸配列を配列番号2にそれぞれ示す。

【0022】

上記のトリガーファクタータイプ P P I a s e、F k p A タイプ P P I a s e、S u r A タイプ P P I a s e、F K B P 5 2 タイプ P P I a s e、C y P 4 0 タイプ P P I a s e 等の P P I a s e もまた、古細菌由来 F K B P 型 P P I a s e と同様に、P P I a s e 活性とは独立した活性として分子シャペロン活性を有することが報告されている。

【0023】

上記トリガーファクタータイプ P P I a s e はほとんどすべてのバクテリアのゲノム上で見つかっている P P I a s e であり、上記トリガーファクタータイプ P P I a s e としては特に限定されず、例えば、大腸菌由来、M y c o p l a s m a g e n i t a l i u m 由来、B a c i l l u s s u b t i l i s 由来、S a l m o n e l l a e n t e r i c a 由来、S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s 由来、M y c o b a c t e r i u m l e p r a e 由来、A g r o b a c t e r i u m t u m e f a c i u m 由来、L a c t o c o c c u s l a c t i s 由来、C a m p y r o b a c t e r j e j u n i 由来、S t r e p t o c o c c u s p y o g e n e s 由来、C o r y n e b a c t e r i u m d i p h t h e r i a e 由来のもの等が挙げられる。また、本発明におけるトリガーファクタータイプ P P I a s e は、アミノ酸配列においてバクテリア由来トリガーファクターと実質的に同じと認められるグループに属するものであれば、いずれのトリガーファクタータイプ P P I a s e であってもよい。上記トリガーファクタータイプ P P I a s e の一例として大腸菌由来のトリガーファクタータイプ P P I a s e のアミノ酸配列を配列番号 3 に示す。

【0024】

上記 F k p A タイプ P P I a s e は、いずれも大腸菌をはじめとするグラム陰性バクテリアのペリプラズム領域に発現する F K B P 型 P P I a s e である。一方、S u r A は、F K 5 0 6 及び他の免疫抑制剤であるシクロスポリンのいずれの免疫抑制剤に対して感受性を示さない、パープリン型 P P I a s e ホモログの 1 つである。これら 2 つの P P I a s e もまた、分子シャペロン活性を示すタンパク質として知られる (R a m m、J. B i o l. C h e m. 275、1710

6一、2000年; Behrens、EMBO. J. 20、285一、2001年)。

上記FkpAタイプPPase及びSurAタイプPPaseは、グラム陰性バクテリアのゲノムに見られるだけでなく、酵母等の真核生物のゲノムでもそのホモログが見つかってきている。

上記FkpAタイプPPase及びSurAタイプPPaseとしては特に限定されず、例えば、大腸菌、*Pyrobaculum aerophilum*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Xylella fastidiosa*、*Neisseria meningitides*、*Mesorhizobium loti*、*Haemophilus influenzae*、*Ralstonia solanacearum*由来のもの等が挙げられる。また、バクテリア由来のものだけでなく、それらと同じグループに属するものであれば、いずれの生物由来のPPaseであってもよい。上記FkpAタイプPPase及びSurAタイプPPaseの一例として、大腸菌由来のもののアミノ酸配列を配列番号4及び配列番号5にそれぞれ示した。

【0025】

上記FKBP52タイプPPase及びCyP40タイプPPaseは、いずれも真核生物中に見いだされるPPaseである。上記FKBP52タイプPPaseは、約52kDa程度のFKBP型PPaseで、p59又はHSP56等とも呼ばれる。そのアミノ酸配列上の構造は、ヒト由来12kDa FKBP型PPaseと相同性の高い領域2つがタンデムに連なり、更にそのC末端側にカルモジュリン結合部位を含む領域が連なった構造をしている(Ratajczak、J. Biol. Chem. 268、13187一、1993)。上記CyP40タイプPPaseは40kDa程度の分子量を持ち、免疫抑制剤であるシクロスポリン感受性であるシクロフィリン型PPaseの1つである。いずれも、そのN末端にPPase活性を担うドメインを、そのC末端にヒートショックタンパク質の1つであるHSP90と結合するテトラトリコペプチドリピート(TPR)を含むドメインを有することを特徴とする、真核生物においてステロイドホルモンレセプター形成に関与するPPaseである(

Galat, Peptidyl-Prolyl cis/trans isomerase Oxford University Press 1998年)。
上記FKBP52タイプPPIase及びCyP40タイプPPIaseとしては特に限定されず、例えば、ヒト、マウス、ウシ、ウサギ、ラット等の真核生物由来のものが挙げられる。また、真核生物由来のものだけでなく、実質的に同じ物と認められるグループに属するものであれば、いずれの生物由来のPPIaseであってもよい。

上記FKBP52タイプPPIase及びCyP40タイプPPIaseの一例として、それぞれヒト由来のもののアミノ酸配列を配列番号6及び配列番号7にそれぞれ示した。

【0026】

本発明における分子シャペロン活性を有するPPIaseとしては、上記例示のもの以外であっても、同等の分子シャペロン活性を有するPPIaseであれば、好適に用いることができ、そのようなものとしては、例えば、最近その分子シャペロン活性が再評価されたブタ由来18kDaシクロフィリン型PPIase (Ou, Protein Sci. 10, 2346-、2001年) 等が挙げられる。

【0027】

本発明において第1コード領域が有効に連結するプロモーターとしては特に限定されず、例えば、Placプロモーター、Ptacプロモーター、xylAプロモーター、AraBプロモーター、lambdaプロモーター、T7プロモーター、gal1/gal10プロモーター、nmt1プロモーター、ポリヘドリンプロモーター、マウスメタロチオネインプロモーター等が挙げられる。

【0028】

本発明の発現ベクターは、上記第1コード領域と同じ解読枠内であって、第1コード領域の下流、即ち3'側にあつて第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域を有する。このような制限酵素サイトはマルチクローニングサイトとも呼ばれる。この領域は、目的とするタンパク質をコードする遺伝子を第2コード領域として挿入する領域である。

本発明の発現ベクターでは、これらのマルチクロニングサイトに目的とするタンパク質をコードする遺伝子を第2コード領域として挿入することにより、第1コード領域とそれに続く第2コード領域が上記プロモーターにより翻訳されて、第2コード領域にコードされている目的タンパク質は分子シャペロン活性を有するポリペプチドとの融合タンパク質として発現される。

【0029】

本発明の発現ベクターは、上記第1コード領域と上記第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域との間にあり、同じ解読枠内で翻訳されてプロテアーゼ消化アミノ酸配列となる領域を有する。

上記プロテアーゼ消化アミノ酸配列は、本発明の発現ベクターの発現により得られる第1コード領域にコードされるタンパク質と第2コード領域にコードされるタンパク質との融合タンパク質において、両タンパク質をつなぐペプチドリンカーとなるものである。両タンパク質をつなぐペプチドリンカーがプロテアーゼ消化アミノ酸配列を有することにより、プロテアーゼを作用させることによって容易に融合タンパク質を消化して、目的とする第2コード領域にコードされるタンパク質を得ることができる。

【0030】

上記プロテアーゼとしては特に限定されず、例えば、トロンビン、ファクターXa、プレシジョンプロテアーゼ等が挙げられる。これらのプロテアーゼはファルマシアバイオテク社等から市販されている。上記ペプチドリンカーとなるべき塩基配列の長さは特に限定されないが、15～90塩基程度であることが好ましく、翻訳されてグリシンやセリン等の中性アミノ酸となる塩基配列を多く含むことが好ましい。

【0031】

本発明の発現ベクターには他の公知の塩基配列が含まれていてもよい。上記他の公知の塩基配列としては特に限定されず、例えば、発現産物の安定性を付与する安定性リーダー配列、発現産物の分泌を付与するシグナル配列、ネオマイシン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、クロラムフェニコール耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子等の形質転換された宿主におい

て表現型選択を付与することが可能なマーキング配列等が挙げられる。

【0032】

本発明の発現ベクターは、得られる融合タンパク質が適当なりガンドを介して固定化担体に結合する形態に設計されていてもよい。これにより発現後、その精製を簡略化することができる。例えば、分子シャペロン活性を有するポリペプチドのN末端側に、ヒスチジン6残基程度のタグを有するよう本発明の発現ベクターを設計すると、得られた融合タンパク質は、ニッケル等の金属をキレートした担体に、ヒスチジン残基を介して結合する。この担体を用いれば、宿主由来のタンパク質と融合タンパク質が簡単に分離できる。担体に結合した融合タンパク質は、プロテアーゼでリンカーを切断することにより、目的タンパク質のみを簡単に担体から遊離させることができる。もちろん、切断することなく、融合タンパク質のまま担体から遊離させることも、イミダゾールで溶出すれば可能である。上記ヒスチジンタグ以外にも、グルタチオン-s-トランスフェラーゼ又はその一部分をタグとし、グルタチオン樹脂によるアフィニティークロマトグラフィーにより精製する方法や、マルトース結合タンパク質又はその一部をタグとし、マルトース樹脂により精製する方法等を用いてもよい。また、分子シャペロン活性を有するポリペプチドとしてFKBP型PPiaseを用いる場合には、FK506が結合した担体を用いれば両者の親和性で精製が簡便化される。同様にシクロフィリン型PPiaseを用いる場合は、そのリガンドとしてシクロスポリンを用いる等、いろいろな組み合わせが可能である。その他、抗体との親和性を用いてもよい。上記の精製タグは、分子シャペロン活性を有するポリペプチドのN端側に設計しても、目的タンパク質のC末端側に設計してもいずれであってもよい。これらの遺伝子操作や、アフィニティー精製方法は、当業者には一般的に理解されているものである。

【0033】

本発明の発現ベクターに目的とするタンパク質をコードする遺伝子を第2コード領域として組み込んで発現させることにより、第1コード領域にコードされる分子シャペロン活性を有するポリペプチドと第2コード領域にコードされるタンパク質との融合タンパク質が得られる。更に、両者の間にプロテアーゼ消化アミノ

酸配列を含むリンカーペプチドが含まれていることから、得られた融合タンパク質をプロテアーゼで消化すれば、目的タンパク質を容易に融合タンパク質から切り出すことができる。

このような、本発明の発現ベクターに第2コード領域を組み込んでなる発現ベクターもまた、本発明の1つである。

また、分子シャペロン活性を有するポリペプチドと第2コード領域がコードするタンパク質とが融合している融合タンパク質であって、分子シャペロン活性を有するポリペプチドと第2コード領域がコードするタンパク質との間にプロテアーゼ消化アミノ酸配列を有する融合タンパク質、及び、第2コード領域がコードするタンパク質であって、上記融合タンパク質をプロテアーゼ消化アミノ酸配列を消化するプロテアーゼで消化して得られるタンパク質もまた、本発明の1つである。

【0034】

上記目的タンパク質としては特に限定されず、例えば、モノクローナル抗体等の抗体等が挙げられる。上記抗体は、いずれの動物種由来の抗体であってもよく、抗体全長、その断片、Fab、Single chain Fv (scFv) 等のその2個以上の断片がリンカーペプチドで連結したポリペプチド等も上記抗体に含まれる。また、上記抗体は、いずれのサブクラスであってもよい。

【0035】

抗体は分子量が10万を越える巨大分子であり、特定の抗原物質に特異的に結合する機能を利用して、分析用試薬、生体外診断薬等として幅広く使用されており、産業的な利用価値が高い。抗体分子と抗原物質との結合に寄与している部分はV領域（可変領域）と呼ばれ、重鎖のV領域と軽鎖のV領域とから構成されている。特定抗原に対する抗体を取得する方法としては、ラットやウサギ等の実験動物に抗原物質を免疫感作させ、その血清に含まれる抗体（ポリクローナル抗体）を得る方法と、次に述べるモノクローナル抗体を得る方法とが一般的である。

【0036】

モノクローナル抗体は、単一クローンの抗体産生細胞が産生する抗体であり、その特徴は一次構造が均一なことである。モノクローナル抗体はケーラーとミルシ

ユタインによるハイブリドーマ技術の確立によって、容易に製造できるようになった。この方法では、まず、所定の抗原物質をマウス等の実験動物に投与し免疫感作を行う。次に、免疫感作された動物の脾臓から、上記抗原物質に対する抗体産生能を獲得した脾臓細胞を取り出し、これをミエローマのような適切な腫瘍細胞と融合させてハイブリドーマを作成する。ついでELISAの様な適当な免疫分析法を用いたスクリーニングにより、目的の抗体を産生しているハイブリドーマを選択する。その後、限界希釈法等を用いてクローニングすることにより、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ株を樹立する。こうして樹立されたハイブリドーマを適当な培地中で培養した後、その代謝産物を含む培地をクロマトグラフ等を用いて分離することにより、目的のモノクローナル抗体が得られる。しかしながら、これらの方法は、動物に対する免疫感作というインビボでの生体反応を利用しているため、必然的に実験動物の介在を必要とする。従って、実験動物を飼育維持しなければならず、煩雑な労力を必要とすると同時に、多大なコストが必要となる。また、この方法では必ずしも全ての抗原物質に対するモノクローナル抗体が製造できるとは限らず、試行錯誤的な要素が含まれる。

【0037】

近年、大腸菌の表層に、抗体の重鎖及び軽鎖のV領域のみを適当なリンカーを介して連結させたscFv又は抗体のFab部分が発現できるようになってきた。これら抗体遺伝子をPCRでランダムに増幅することで抗体遺伝子のライブラリーを作成し、細胞外に提示させ、これらのライブラリーから特定抗原に親和性を有するものをスクリーニングする方法が開発されつつある（熊谷ら、タンパク質・核酸・酵素 43、159-、1998年）。スクリーニングによって得られた抗体遺伝子を大腸菌等を用いて発現すれば、目的の抗原に対する抗体を、実験動物を用いることなく作成することが可能である。しかしながら、例えば抗体遺伝子を大腸菌内で大量発現させる場合、前述の通り、ほとんどが不溶性の封入体として発現され、活性型を得ることはできなかった。

これに対して、本発明の発現ベクターによれば、スクリーニングで得られた抗体の活性型（可溶型）産物を簡単に取得することが可能となる。

【0038】

本発明の発現ベクターは宿主に導入されて目的タンパク質の発現に供される。上記宿主としては特に限定されず、例えば、細菌等の原核生物、酵母、真菌、植物、昆虫細胞、ほ乳類細胞等が挙げられるが、使用される宿主と発現ベクターの特性は適合しなければならない。例えば、ほ乳類細胞系において融合タンパク質を発現する場合、発現ベクターは、ほ乳類細胞のゲノムから単離された、例えばマウスメタロチオネインプロモーター等のプロモーターや、これらの細胞で成長するウイルスから単離された、例えばバキュロウイルスプロモーター、ワクシニアウイルス7.5 Kプロモーター等のプロモーターを用いることが好ましい。

【0039】

上記宿主としては、なかでも大腸菌等の原核生物が好適に用いられる。グラム陰性細菌を宿主として用いる場合、融合タンパク質の発現は、細胞質であっても、ペリプラズム領域への発現であっても良い。

【0040】

本発明の発現ベクターを宿主に導入する方法としては特に限定されず、公知の種々の方法を用いることができ、例えば、トランスフェクションとしてリン酸カルシウム沈殿法、電気穿孔、リポソーム融合、核注入、ウイルス又はファージ感染等が挙げられる。本発明の発現ベクターを内包する宿主もまた、本発明の1つである。

【0041】

本発明の発現ベクターを適切な宿主に導入し、宿主を大量の融合タンパク質を発現させる条件下で培養する。

分子シャペロン活性を有するポリペプチドと第2コード領域がコードするタンパク質とが融合している融合タンパク質を製造する方法であって、上記宿主を、それが内包する発現ベクターの発現条件下で培養する融合タンパク質の製造方法、及び、第2コード領域がコードするタンパク質の製造方法であって、上記宿主を、それが内包する発現ベクターの発現条件下で培養し、得られた融合タンパク質をプロテアーゼ消化アミノ酸配列を消化するプロテアーゼで消化するタンパク質の製造方法もまた、本発明の1つである。

【0042】

本発明によれば、目的のタンパク質を分子シャペロン活性を有するポリペプチドとともにペプチドリンカーで連結させ、融合タンパク質として発現させることで、本来、異常型として発現される難発現性タンパク質を天然型の可溶体として大量に発現でき、その生産性を大幅に飛躍させることができる。また、目的タンパク質が抗体である場合、本発明によれば、実験動物を用いることなく簡便に機能を有した組み換え型抗体を調製することが可能となるので、他のタンパク質やペプチド等と融合させることで、高機能な抗体を大量調製することが可能となる。

【0043】

【実施例】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

【0044】

(実施例1) 超好熱性古細菌 *Thermococcus* sp. KS-1 由来ショートタイプFKBP型PPIase (TcFKBP18) と融合するための発現ベクター構築

分子シャペロン活性を有するTcFKBP18 (Ideno、Biochem. J. 357、465-、2001年) の発現プラスミドpEFE1-3 (Iida、Gene 222、249-、1998) を鋳型とし、そのTcFKBP18 遺伝子断片をPCR法により増幅した。PCR用のプライマーとして、表1に示したTcFu-F1及びTcFu-R2を用いることにより増幅産物の両端に制限酵素サイトを設けた。一方、TcFKBP18 融合タンパク質をプロテアーゼによりTcFKBP18 と目的タンパク質とに切断するためのリンカーをコードする塩基配列として、Throm-F2 及びその相補鎖を設計した。Throm-F2 は、その5' 側にSpeIサイトを、3' 側にEcoRIサイトをそれぞれ有している(図1)。Throm-F2 のトロンビン切断部分のDNA配列の下流には、BamHIサイト、NdeIサイトを有しているため、目的タンパク質の遺伝子断片はこれらの制限酵素サイトを利用して導入することにより、TcFKBP18 との融合タンパク質を得ることができる(図1)。

上記TcFKBP18 の遺伝子断片と、トロンビン切断部分をコードするDNA

断片を、各々の制限酵素で処理し、あらかじめNco I/EcoRIにて処理したpET21dプラスミドDNA（ノバジェン社製）に、TcFKBP18遺伝子-Thermo-F2の順でライゲーションした。得られたTcFKBP18融合タンパク質発現用プラスミドをTcFKfusion2とした。

【0045】

【表1】

Abbrev.	Sequence	Restriction site
Tcfu-F1	5'-GGCCATGGGAAAAGTTGAAGCTGGTGAT-3'	Nco I
Tcfu-R2	5'-CCACTAGTAGCTTCTGAGTCCTCTTC-3'	Spe I
SCF-F3	5'-ATCATATGAAATACCTATTGCCTACG-3'	Nde I
SCF-R3	5'-ATGCGGCCCGCCTATTACTCCAGCTTGGTCCCTC-3'	Not I

アンダーライン: 各制限酵素サイト

【0046】

(実施例2) TcFKfusion2を用いたTcFKBP18の発現
TcFKfusion2をE. coli BL21 (DE3) 株にトランスフォーメーションした。2Lの三角フラスコに2×YT培地 (Yeast Extract 16g/L、BACTO TRYPTON 20g/L、NaCl 5g/L、アンピシリン 100マイクロg/mL、pH7.5) 700mLを入れ、組み換え大腸菌2～3白金耳を接種した。35℃で24時間回転培養 (110rpm) した後、遠心分離 (10000rpm×10min) にて菌体を回収した。得られた菌体は1mM EDTAを含む25mM HEPES緩衝液 (pH6.8) 20mLに懸濁し、-20℃にて凍結保存した。

【0047】

得られた菌液を超音波破碎後、遠心分離し、その上清 (可溶性画分) と沈殿部 (沈殿画分) に分離した。沈殿画分は、更に封入体画分に精製するため、4% Triton X-100を含む25mM HEPES/1mM EDTA緩衝液 (pH6.8) に懸濁後、30分間反応させることで膜成分を可溶化し、遠心分離にて沈殿する封入体成分を回収した。この操作を2回繰り返し、得られた沈殿

部を封入体画分とした。可溶性画分 $10 \mu\text{g}$ と、それに相当する封入体画分の容量をそれぞれ 16% SDS-PAGE に供した。その結果、TcFKBP18 に相当するバンドは、可溶性画分のみに見られた。本来 TcFKBP18 が検出させる位置よりも見かけ上高分子量の位置に検出されたが (図 2)、これは、TcFKBP18 の構造遺伝子の 3' 末端に終止コドンが存在せず、マルチクローニングサイトが存在するため、その翻訳産物が TcFKBP18 の C 末端に連なっているためであると考えられる。

【0048】

(実施例 3) TcFKBP18 とマウス由来 anti-ニワトリリゾチーム (HEL) Fab 抗体フラグメント (D1.3) からなる融合タンパク質の発現
マウス由来 anti-HEL Fab 抗体フラグメントの発現プラスミド pEHEL Fab-1 (Ideno, Appl. Env. Microbiol. 68, 464-2002) を Nde I/Bpu1102 I により処理し、アガロースゲルを用いた電気泳動法により、anti-HEL Fab 抗体フラグメント遺伝子断片を精製した。あらかじめ Nde I/Bpu1102 I 処理しておいた TcFK fusion 2 に、この DNA 断片をライゲーションした。この結果得られたプラスミドを発現すると、上記 Fab の重鎖部分は TcFKBP18 との融合タンパク質として発現され、軽鎖部分は融合タンパク質になることなく、単独で発現することとなる。得られたプラスミドを、実施例 2 と同様の方法で大腸菌に組み込み、そのトランスフォーマントを取得した。本菌を実施例 2 と同様の方法で培養・回収し、 -20°C にて凍結保存した。

【0049】

得られた菌液を超音波破碎後、遠心分離し、その上清 (可溶性画分) と沈殿部 (沈殿画分) に分離し、実施例 2 と同様の方法により SDS-PAGE に供した。SDS-PAGE ゲルは、クーマシーブリリアントブルー (CBB) による染色と、ウサギ由来抗 D1.3 抗体を 1 次抗体として用いたウェスタンブロッティング法により、発現した Fab を特異的に検出した。

宿主菌である大腸菌の可溶性画分及び沈殿画分には、CBB 染色、ウェスタンブロッティングによる検出のいずれにおいても、Fab と TcFKBP18 との融

合タンパク質に相当するバンドは見られなかった(図3)。一方、TcFKBP 18との融合タンパク質として発現させた場合、CBB染色において、Fabの重鎖部分はTcFKBP 18と融合した形態で可溶画分にメジャーバンドとして発現されることが示され、ウエスタンブロッティングにおいても、確かにFabが大量に発現していることが明らかとなった(図4)。それに対し、Fabの軽鎖部分に相当するバンドは見られなかった。ウエスタンブロッティングの結果より、Fabの軽鎖は宿主由来のプロテアーゼで分解していると考えられた(図4)。

【0050】

(比較例1) マウス由来 anti-HEL Fab抗体フラグメントの単体での発現

マウス由来 anti-HEL Fab抗体フラグメントの発現プラスミド pEHEL Fab-1を実施例2と同様の方法で大腸菌に組み込み、実施例3と同様の方法により、SDS-PAGEに供した。CBB染色及びウエスタンブロッティングの結果、Fab遺伝子は、単独では可溶画分への発現は見られず、すべて沈殿画分に発現することが確認された(図5)。

【0051】

(実施例4) マウス由来 anti-HEL scFvとTcFKBP 18との融合タンパク質の発現

マウス由来 anti-HEL scFvフラグメントの発現プラスミド pAALSC(伊庭ら 1997、Gene 194、35-)を鋳型とし、表1に示したSCF-F3及びSCF-R3をプライマーして用いるPCRにより、マウス由来 anti-HEL scFvフラグメントの遺伝子を増幅した。この遺伝子をTAクローニングにより、pT7ブルーベクターにライゲーションし、Nde I/Not I処理後、あらかじめ同制限酵素により処理しておいたTcFK fusion 2に再度ライゲーションすることで、TcFKBP 18とscFvの融合タンパク質発現系を構築した。得られたプラスミドを、実施例2と同様の方法で大腸菌に組み込み、そのトランスフォーマントを取得した。本菌を実施例2と同様の方法で培養・回収し、-20℃にて凍結保存した。得られた菌液を実施例

3と同様の方法でSDS-PAGEに供し、CBBにて染色した。

宿主菌である大腸菌の可溶性画分及び沈殿画分には、CBB染色においてマウス由来 anti-HEL scFv と TcFKBP18 との融合タンパク質に相当するバンドは見られなかった(図6A)。一方、TcFKBP18 との融合タンパク質として発現させた場合、マウス由来 anti-HEL scFv は TcFKBP18 と融合した形態で可溶画分にメジャーバンドとして大量に発現されることが示された(図6B)。

【0052】

(比較例2) マウス由来 anti-HEL scFv の単体での発現
実施例4で得られたマウス由来 anti-HEL scFv 遺伝子を含む pT7 ブルーベクターを NdeI / NotI 処理後、あらかじめ同制限酵素により処理しておいた pET21a (ノバジェン社製) に再度ライゲーションすることで、マウス由来 anti-HEL scFv の発現系を構築した。得られた発現プラスミドを実施例4と同様の方法で大腸菌に組み込み、そのトランスフォーマントを取得した。本菌を実施例2と同様の方法で培養・回収し、-20℃にて凍結保存した。得られた菌液を実施例3に示した方法と同様に SDS-PAGE に供し、CBBにて染色した。その結果、マウス由来 anti-HEL scFv は可溶画分にはほとんど発現せず、ほとんどが不溶性画分に発現することが確認された(図6C)。

【0053】

(実施例5) マウス由来 anti-HEL scFv-TcFKBP18 融合タンパク質の精製

実施例4で得られた可溶性画分を下記の(a)及び(b)の陰イオン交換クロマトグラフィー及びゲル濾過の順でカラム精製を繰り返すことにより、マウス由来 anti-HEL scFv-TcFKBP18 の融合タンパク質をほぼ単一にまで精製した。精製の結果得られた融合タンパク質の量は、培地1Lあたり約50mgであった。

【0054】

(a) DEAE Toyopearl column (16mm x 60cm

; TOSOH Co.、Ltd.)

A液: 25mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 6.8)

B液: 0.5M NaClを含む25mM HEPES-KOH 緩衝液 (pH 6.8)

(0-300min: B液0-100%の直線グラジエント、300-420min: B液100%)

流速: 1mL/min

【0055】

(b) HiLoad 26/60 Superdex 200pg column (26mm x 60cm; Amersham Pharmacia)

溶離液: 100mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0; 0.15M NaCl含有)

流速: 3mL/min

【0056】

(実施例6) 融合タンパク質のトロンビンによる切断

実施例5で精製した融合タンパク質1mgあたりに、10Uのトロンビンを加え、22℃にて16時間処理することにより、融合タンパク質のトロンビンサイトを切断した。SDS-PAGEの結果、融合タンパク質は確かにマウス由来 anti-HEL scFvとTcFKBP18とに切断されることが確認された (図7)。

【0057】

(実施例7) ELISAによるマウス由来 anti-HEL scFvの機能確認

発現で得られたマウス由来 anti-HEL scFvの機能は、ニワトリリゾチームを抗原とするELISA法において、1次抗体として機能するか否かで評価した。即ち、96穴プレートに50μg/mLニワトリ卵白リゾチーム (HEL) 溶液100μLを添加し、30℃にて3時間インキュベーションすることにより、HELをプレート上に固定化した。TBS緩衝液 (pH 7.0) にてプレートを洗浄後、ブロックエース (大日本製薬社製) を含むTBS緩衝液でブロッ

キングした(4℃、オーバーナイト)。TBSにて洗浄後、実施例6で得られたマウス由来 anti-HEL scFv 24 µgを含むTBS(10% ブロックエース含有)を用い、室温にて3時間インキュベートした。TBSにて洗浄後、2次抗体としてAnti-マウスIgG-HRPコンジュゲート(フナコシ社製)を含むTBS緩衝液でインキュベート(2時間、30℃)した。TBSにて洗浄後、HRPの基質としてABTS液(フナコシ社製)100 µLを加え、30分間インキュベートし、OD405を測定した。得られた結果を図8に示した。プレートに固定したHEL濃度に応じて、吸光度が増大することから(▲)、得られたscFvが抗原と結合していることが確認された。一方、HELの代わりに同濃度のキモトリプシンインヒビター(□)を用いた場合、吸光度の上昇は見られなかった。このことは発現して得られた抗体が特異的に抗原に結合することを示していると思われる。

【0058】

【発明の効果】

本発明は、上述の構成よりなるので、これまでバクテリアや酵母、昆虫細胞等を用いたタンパク質発現系において問題となっていた封入体の形成を防ぎ、正常型タンパク質を可溶性画分に大量に発現させることを可能とする。これにより、従来のようにインビトロで封入体を正常型タンパク質にリフォールディングするといった手間が不要となる。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>積水化学工業株式会社 SEKISUI CHEMICAL CO., LTD.

<120>発現ベクター、宿主、融合タンパク質、タンパク質、融合タンパク質の製造方法及びタンパク質の製造方法

<130>02P00846

<160> 7

<210> 1

<211> 257

<212> PRT

<213> Pyrococcus horikoshii

<400> 1

Met	Lys	Val	Glu	Arg	Gly	Asp	Val	Ile	Arg	Leu	His	Tyr	Thr	Gly	Arg
1				5					10					15	

Val	Lys	Glu	Thr	Gly	Gln	Ile	Phe	Asp	Thr	Thr	Tyr	Glu	Glu	Val	Ala
				20				25						30	

Lys	Glu	Ala	Gly	Ile	Tyr	Asn	Pro	Lys	Gly	Ile	Tyr	Gly	Pro	Val	Pro
		35					40					45			

Ile	Ile	Val	Gly	Ala	Gly	His	Val	Ile	Ser	Gly	Leu	Asp	Lys	Arg	Leu
		50				55					60				

Val	Gly	Leu	Glu	Val	Gly	Lys	Lys	Tyr	Thr	Leu	Glu	Val	Pro	Pro	Glu
		65				70				75					80

Glu	Gly	Phe	Gly	Leu	Arg	Asp	Pro	Lys	Leu	Ile	Lys	Val	Phe	Thr	Met
				85					90					95	

Gly	Gln	Phe	Arg	Lys	Gln	Gly	Ile	Val	Pro	Phe	Pro	Gly	Leu	Glu	Val
				100				105					110		

Glu Val Thr Thr Asp Asn Gly Arg Lys Met Lys Gly Arg Val Ile Thr
115 120 125

Val Ser Gly Gly Arg Val Arg Val Asp Phe Asn His Pro Leu Ala Gly
130 135 140

Lys Thr Leu Ile Tyr Glu Val Glu Ile Val Glu Lys Ile Glu Asp Pro
145 150 155 160

Ile Glu Lys Ile Lys Ala Leu Ile Glu Leu Arg Leu Pro Met Ile Asp
165 170 175

Arg Asp Lys Val Ile Ile Glu Val Gly Glu Lys Asp Val Lys Val Asn
180 185 190

Phe Gly Glu Gln Asp Val Asp Pro Lys Thr Leu Ile Leu Gly Glu Ile
195 200 205

Leu Leu Glu Ser Asp Ile Lys Phe Leu Gly Tyr Glu Lys Val Glu Phe
210 215 220

Lys Pro Ser Val Glu Glu Leu Leu Arg Pro Lys Gln Glu Glu Pro Val
225 230 235 240

Glu Glu Glu Lys Lys Glu Glu Gln Glu Glu Ser Glu Glu Ala Gln Ser
245 250 255

Ser

<210> 2

<211> 157

<212> PRT

<213> Methanococcus jannaschii

<400> 2

Leu Ile Asn Leu Ile Lys Lys Gly Asp Tyr Val Lys Val Asp Tyr Ile
1 5 10 15

Leu Glu Val Asp Gly Lys Val Ile Asp Thr Ser Ile Glu Glu Val Ala
20 25 30

Lys Glu Asn Lys Ile Tyr Tyr Pro Glu Arg Glu Tyr Glu Pro Ile Gly
35 40 45

Phe Ile Val Gly Asn Gly Glu Leu Ile Glu Gly Phe Glu Glu Ala Val
50 55 60

Ile Gly Met Glu Val Gly Glu Glu Lys Thr Val Thr Ile Pro Pro Glu
65 70 75 80

Lys Gly Tyr Gly Leu Arg Asp Glu Arg Leu Ile Gln Glu Ile Pro Lys
85 90 95

Glu Met Phe Ala Asp Ala Asp Phe Glu Pro Gln Glu Gly Met Leu Ile
100 105 110

Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Lys Ile Ile Lys Val Thr Asp Asp Thr
115 120 125

Val Thr Leu Asp Phe Asn His Glu Leu Ala Gly Lys Glu Leu Lys Phe
130 135 140

Thr Ile Lys Val Arg Asp Val Gln Pro Ala Glu Ser Glu
145 150 155

<210> 3

<211> 432

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 3

Met Gln Val Ser Val Glu Thr Thr Gln Gly Leu Gly Arg Arg Val Thr
1 5 10 15

Ile Thr Ile Ala Ala Asp Ser Ile Glu Thr Ala Val Lys Ser Glu Leu
20 25 30

Val Asn Val Ala Lys Lys Val Arg Ile Asp Gly Phe Arg Lys Gly Lys
35 40 45

Val Pro Met Asn Ile Val Ala Gln Arg Tyr Gly Ala Ser Val Arg Gln
50 55 60

Asp Val Leu Gly Asp Leu Met Ser Arg Asn Phe Ile Asp Ala Ile Ile

65

70

75

80

Lys Glu Lys Ile Asn Pro Ala Gly Ala Pro Thr Tyr Val Pro Gly Glu

85

90

95

Tyr Lys Leu Gly Glu Asp Phe Thr Tyr Ser Val Glu Phe Glu Val Tyr

100

105

110

Pro Glu Val Glu Leu Gln Gly Leu Glu Ala Ile Glu Val Glu Lys Pro

115

120

125

Ile Val Glu Val Thr Asp Ala Asp Val Asp Gly Met Leu Asp Thr Leu

130

135

140

Arg Lys Gln Gln Ala Thr Trp Lys Glu Lys Asp Gly Ala Val Glu Ala

145

150

155

160

Glu Asp Arg Val Thr Ile Asp Phe Thr Gly Ser Val Asp Gly Glu Glu

165

170

175

Phe Glu Gly Gly Lys Ala Ser Asp Phe Val Leu Ala Met Gly Gln Gly

180

185

190

Arg Met Ile Pro Gly Phe Glu Asp Gly Ile Lys Gly His Lys Ala Gly

195

200

205

Glu Glu Phe Thr Ile Asp Val Thr Phe Pro Glu Glu Tyr His Ala Glu

210

215

220

Asn Leu Lys Gly Lys Ala Ala Lys Phe Ala Ile Asn Leu Lys Lys Val
225 230 235 240

Glu Glu Arg Glu Leu Pro Glu Leu Thr Ala Glu Phe Ile Lys Arg Phe
245 250 255

Gly Val Glu Asp Gly Ser Val Glu Gly Leu Arg Ala Glu Val Arg Lys
260 265 270

Asn Met Glu Arg Glu Leu Lys Ser Ala Ile Arg Asn Arg Val Lys Ser
275 280 285

Gln Ala Ile Glu Gly Leu Val Lys Ala Asn Asp Ile Asp Val Pro Ala
290 295 300

Ala Leu Ile Asp Ser Glu Ile Asp Val Leu Arg Arg Gln Ala Ala Gln
305 310 315 320

Arg Phe Gly Gly Asn Glu Lys Gln Ala Leu Glu Leu Pro Arg Glu Leu
325 330 335

Phe Glu Glu Gln Ala Lys Arg Arg Val Val Val Gly Leu Leu Leu Gly
340 345 350

Glu Val Ile Arg Thr Asn Glu Leu Lys Ala Asp Glu Glu Arg Val Lys
355 360 365

Gly Leu Ile Glu Glu Met Ala Ser Ala Tyr Glu Asp Pro Lys Glu Val
370 375 380

Ile Glu Phe Tyr Ser Lys Asn Lys Glu Leu Met Asp Asn Met Arg Asn
385 390 395 400

Val Ala Leu Glu Glu Gln Ala Val Glu Ala Val Leu Ala Lys Ala Lys
405 410 415

Val Thr Glu Lys Glu Thr Thr Phe Asn Glu Leu Met Asn Gln Gln Ala
420 425 430

<210> 4

<211> 270

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Lys Ser Leu Phe Lys Val Thr Leu Leu Ala Thr Thr Met Ala Val
1 5 10 15

Ala Leu His Ala Pro Ile Thr Phe Ala Ala Glu Ala Ala Lys Pro Ala
20 25 30

Thr Ala Ala Asp Ser Lys Ala Ala Phe Lys Asn Asp Asp Gln Lys Ser
35 40 45

Ala Tyr Ala Leu Gly Ala Ser Leu Gly Arg Tyr Met Glu Asn Ser Leu
50 55 60

Lys Glu Gln Glu Lys Leu Gly Ile Lys Leu Asp Lys Asp Gln Leu Ile
65 70 75 80

Ala Gly Val Gln Asp Ala Phe Ala Asp Lys Ser Lys Leu Ser Asp Gln
85 90 95

Glu Ile Glu Gln Thr Leu Gln Ala Phe Glu Ala Arg Val Lys Ser Ser
100 105 110

Ala Gln Ala Lys Met Glu Lys Asp Ala Ala Asp Asn Glu Ala Lys Gly
115 120 125

Lys Glu Tyr Arg Glu Lys Phe Ala Lys Glu Lys Gly Val Lys Thr Ser
130 135 140

Ser Thr Gly Leu Val Tyr Gln Val Val Glu Ala Gly Lys Gly Glu Ala
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ser Asp Thr Val Val Val Asn Tyr Lys Gly Thr Leu Ile
165 170 175

Asp Gly Lys Glu Phe Asp Asn Ser Tyr Thr Arg Gly Glu Pro Leu Ser
180 185 190

Phe Arg Leu Asp Gly Val Ile Pro Gly Trp Thr Glu Gly Leu Lys Asn
195 200 205

Ile Lys Lys Gly Gly Lys Ile Lys Leu Val Ile Pro Pro Glu Leu Ala
210 215 220

Tyr Gly Lys Ala Gly Val Pro Gly Ile Pro Pro Asn Ser Thr Leu Val
225 230 235 240

Phe Asp Val Glu Leu Leu Asp Val Lys Pro Ala Pro Lys Ala Asp Ala
245 250 255

Lys Pro Glu Ala Asp Ala Lys Ala Ala Asp Ser Ala Lys Lys
260 265 270

<210> 5

<211> 428

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 5

Met Lys Asn Trp Lys Thr Leu Leu Leu Gly Ile Ala Met Ile Ala Asn
1 5 10 15

Thr Ser Phe Ala Ala Pro Gln Val Val Asp Lys Val Ala Ala Val Val
20 25 30

Asn Asn Gly Val Val Leu Glu Ser Asp Val Asp Gly Leu Met Gln Ser
35 40 45

Val Lys Leu Asn Ala Ala Gln Ala Arg Gln Gln Leu Pro Asp Asp Ala
50 55 60

Thr Leu Arg His Gln Ile Met Glu Arg Leu Ile Met Asp Gln Ile Ile
65 70 75 80

Leu Gln Met Gly Gln Lys Met Gly Val Lys Ile Ser Asp Glu Gln Leu
85 90 95

Asp Gln Ala Ile Ala Asn Ile Ala Lys Gln Asn Asn Met Thr Leu Asp
100 105 110

Gln Met Arg Ser Arg Leu Ala Tyr Asp Gly Leu Asn Tyr Asn Thr Tyr
115 120 125

Arg Asn Gln Ile Arg Lys Glu Met Ile Ile Ser Glu Val Arg Asn Asn
130 135 140

Glu Val Arg Arg Arg Ile Thr Ile Leu Pro Gln Glu Val Glu Ser Leu
145 150 155 160

Ala Gln Gln Val Gly Asn Gln Asn Asp Ala Ser Thr Glu Leu Asn Leu
165 170 175

Ser His Ile Leu Ile Pro Leu Pro Glu Asn Pro Thr Ser Asp Gln Val
180 185 190

Asn Glu Ala Glu Ser Gln Ala Arg Ala Ile Val Asp Gln Ala Arg Asn
195 200 205

Gly Ala Asp Phe Gly Lys Leu Ala Ile Ala His Ser Ala Asp Gln Gln
210 215 220

Ala Leu Asn Gly Gly Gln Met Gly Trp Gly Arg Ile Gln Glu Leu Pro
225 230 235 240

Gly Ile Phe Ala Gln Ala Leu Ser Thr Ala Lys Lys Gly Asp Ile Val
245 250 255

Gly Pro Ile Arg Ser Gly Val Gly Phe His Ile Leu Lys Val Asn Asp
260 265 270

Leu Arg Gly Glu Ser Lys Asn Ile Ser Val Thr Glu Val His Ala Arg
275 280 285

His Ile Leu Leu Lys Pro Ser Pro Ile Met Thr Asp Glu Gln Ala Arg
290 295 300

Val Lys Leu Glu Gln Ile Ala Ala Asp Ile Lys Ser Gly Lys Thr Thr
305 310 315 320

Phe Ala Ala Ala Ala Lys Glu Phe Ser Gln Asp Pro Gly Ser Ala Asn
325 330 335

Gln Gly Gly Asp Leu Gly Trp Ala Thr Pro Asp Ile Phe Asp Pro Ala
340 345 350

Phe Arg Asp Ala Leu Thr Arg Leu Asn Lys Gly Gln Met Ser Ala Pro

355

360

365

Val His Ser Ser Phe Gly Trp His Leu Ile Glu Leu Leu Asp Thr Arg

370

375

380

Asn Val Asp Lys Thr Asp Ala Ala Gln Lys Asp Arg Ala Tyr Arg Met

385

390

395

400

Leu Met Asn Arg Lys Phe Ser Glu Glu Ala Ala Ser Trp Met Gln Glu

405

410

415

Gln Arg Ala Ser Ala Tyr Val Lys Ile Leu Ser Asn

420

425

<210> 6

<211> 459

<212> PRT

<213> human

<400> 6

Met Thr Ala Glu Glu Met Lys Ala Thr Glu Ser Gly Ala Gln Ser Ala

1

5

10

15

Pro Leu Pro Met Glu Gly Val Asp Ile Ser Pro Lys Gln Asp Glu Gly

20

25

30

Val Leu Lys Val Ile Lys Arg Glu Gly Thr Gly Thr Glu Met Pro Met

35

40

45

Ile Gly Asp Arg Val Phe Val His Tyr Thr Gly Trp Leu Leu Asp Gly
50 55 60

Thr Lys Phe Asp Ser Ser Leu Asp Arg Lys Asp Lys Phe Ser Phe Asp
65 70 75 80

Leu Gly Lys Gly Glu Val Ile Lys Ala Trp Asp Ile Ala Ile Ala Thr
85 90 95

Met Lys Val Gly Glu Val Cys His Ile Thr Cys Lys Pro Glu Tyr Ala
100 105 110

Tyr Gly Ser Ala Gly Ser Pro Pro Lys Ile Pro Pro Asn Ala Thr Leu
115 120 125

Val Phe Glu Val Glu Leu Phe Glu Phe Lys Gly Glu Asp Leu Thr Glu
130 135 140

Glu Glu Asp Gly Gly Ile Ile Arg Arg Ile Gln Thr Arg Gly Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Ala Lys Pro Asn Glu Gly Ala Ile Val Glu Val Ala Leu Glu Gly
165 170 175

Tyr Tyr Lys Asp Lys Leu Phe Asp Gln Arg Glu Leu Arg Phe Glu Ile
180 185 190

Gly Glu Gly Glu Asn Leu Asp Leu Pro Tyr Gly Leu Glu Arg Ala Ile

195

200

205

Gln Arg Met Glu Lys Gly Glu His Ser Ile Val Tyr Leu Lys Pro Ser

210

215

220

Tyr Ala Phe Gly Ser Val Gly Lys Glu Lys Phe Gln Ile Pro Pro Asn

225

230

235

240

Ala Glu Leu Lys Tyr Glu Leu His Leu Lys Ser Phe Glu Lys Ala Lys

245

250

255

Glu Ser Trp Glu Met Asn Ser Glu Glu Lys Leu Glu Gln Ser Thr Ile

260

265

270

Val Lys Glu Arg Gly Thr Val Tyr Phe Lys Glu Gly Lys Tyr Lys Gln

275

280

285

Ala Leu Leu Gln Tyr Lys Lys Ile Val Ser Trp Leu Glu Tyr Glu Ser

290

295

300

Ser Phe Ser Asn Glu Glu Ala Gln Lys Ala Gln Ala Leu Arg Leu Ala

305

310

315

320

Ser His Leu Asn Leu Ala Met Cys His Leu Lys Leu Gln Ala Phe Ser

325

330

335

Ala Ala Ile Glu Ser Cys Asn Lys Ala Leu Glu Leu Asp Ser Asn Asn

340

345

350

Glu Lys Gly Leu Phe Arg Arg Gly Glu Ala His Leu Ala Val Asn Asp
355 360 365

Phe Glu Leu Ala Arg Ala Asp Phe Gln Lys Val Leu Gln Leu Tyr Pro,
370 375 380

Asn Asn Lys Ala Ala Lys Thr Gln Leu Ala Val Cys Gln Gln Arg Ile
385 390 395 400

Arg Arg Gln Leu Ala Arg Glu Lys Lys Leu Tyr Ala Asn Met Phe Glu
405 410 415

Arg Leu Ala Glu Glu Glu Asn Lys Ala Lys Ala Glu Ala Ser Ser Gly
420 425 430

Asp His Pro Thr Asp Thr Glu Met Lys Glu Glu Gln Lys Ser Asn Thr
435 440 445

Ala Gly Ser Gln Ser Gln Val Glu Thr Glu Ala
450 455

<210> 7

<211> 370

<212> PRT

<213> human

<400> 7

Met Ser His Pro Ser Pro Gln Ala Lys Pro Ser Asn Pro Ser Asn Pro

1

5

10

15

Arg Val Phe Phe Asp Val Asp Ile Gly Gly Glu Arg Val Gly Arg Ile

20

25

30

Val Leu Glu Leu Phe Ala Asp Ile Val Pro Lys Thr Ala Glu Asn Phe

35

40

45

Arg Ala Leu Cys Thr Gly Glu Lys Gly Ile Gly His Thr Thr Gly Lys

50

55

60

Pro Leu His Phe Lys Gly Cys Pro Phe His Arg Ile Ile Lys Lys Phe

65

70

75

80

Met Ile Gln Gly Gly Asp Phe Ser Asn Gln Asn Gly Thr Gly Gly Glu

85

90

95

Ser Ile Tyr Gly Glu Lys Phe Glu Asp Glu Asn Phe His Tyr Lys His

100

105

110

Asp Arg Glu Gly Leu Leu Ser Met Ala Asn Ala Gly Arg Asn Thr Asn

115

120

125

Gly Ser Gln Phe Phe Ile Thr Thr Val Pro Thr Pro His Leu Asp Gly

130

135

140

Lys His Val Val Phe Gly Gln Val Ile Lys Gly Ile Gly Val Ala Arg

145

150

155

160

Ile Leu Glu Asn Val Glu Val Lys Gly Glu Lys Pro Ala Lys Leu Cys
165 170 175

Val Ile Ala Glu Cys Gly Glu Leu Lys Glu Gly Asp Asp Gly Gly Ile
180 185 190

Phe Pro Lys Asp Gly Ser Gly Asp Ser His Pro Asp Phe Pro Glu Asp
195 200 205

Ala Asp Ile Asp Leu Lys Asp Val Asp Lys Ile Leu Leu Ile Thr Glu
210 215 220

Asp Leu Lys Asn Ile Gly Asn Thr Phe Phe Lys Ser Gln Asn Trp Glu
225 230 235 240

Met Ala Ile Lys Lys Tyr Ala Glu Val Leu Arg Tyr Val Asp Ser Ser
245 250 255

Lys Ala Val Ile Glu Thr Ala Asp Arg Ala Lys Leu Gln Pro Ile Ala
260 265 270

Leu Ser Cys Val Leu Asn Ile Gly Ala Cys Lys Leu Lys Met Ser Asn
275 280 285

Trp Gln Gly Ala Ile Asp Ser Cys Leu Glu Ala Leu Glu Leu Asp Pro
290 295 300

Ser Asn Thr Lys Ala Leu Tyr Arg Arg Ala Gln Gly Trp Gln Gly Leu
305 310 315 320

Lys Glu Tyr Asp Gln Ala Leu Ala Asp Leu Lys Lys Ala Gln Gly Ile
325 330 335

Ala Pro Glu Asp Lys Ala Ile Gln Ala Glu Leu Leu Lys Val Lys Gln
340 345 350

Lys Ile Lys Ala Gln Lys Asp Lys Glu Lys Ala Val Tyr Ala Lys Met
355 360 365

Phe Ala

370

【図面の簡単な説明】

【図 1】

Thermococcus sp. KS-1 由来ショートタイプFKBP型PPIaseと融合タンパク質を作成するためのベクターTcFKfusion2の遺伝子配置を示す図である。

【図 2】

TcFKfusion2を用いた場合のTcFKBP18の発現を示す図である。

【図 3】

宿主由来のタンパク質の電気泳動パターンを示す図である。

【図 4】

マウス由来anti-ニワトリリゾチーム(HEL)Fab抗体フラグメント及びそのTcFKBP18との融合タンパク質の発現を示す図である。

【図 5】

マウス由来anti-ニワトリリゾチーム(HEL)Fab抗体フラグメントの単体での発現を示す図である。

【図 6】

マウス由来 anti-ニワトリリゾチーム (HEL) scFv フラグメント及びその TcFKBP18 との融合タンパク質の発現を示す図である。

【図 7】

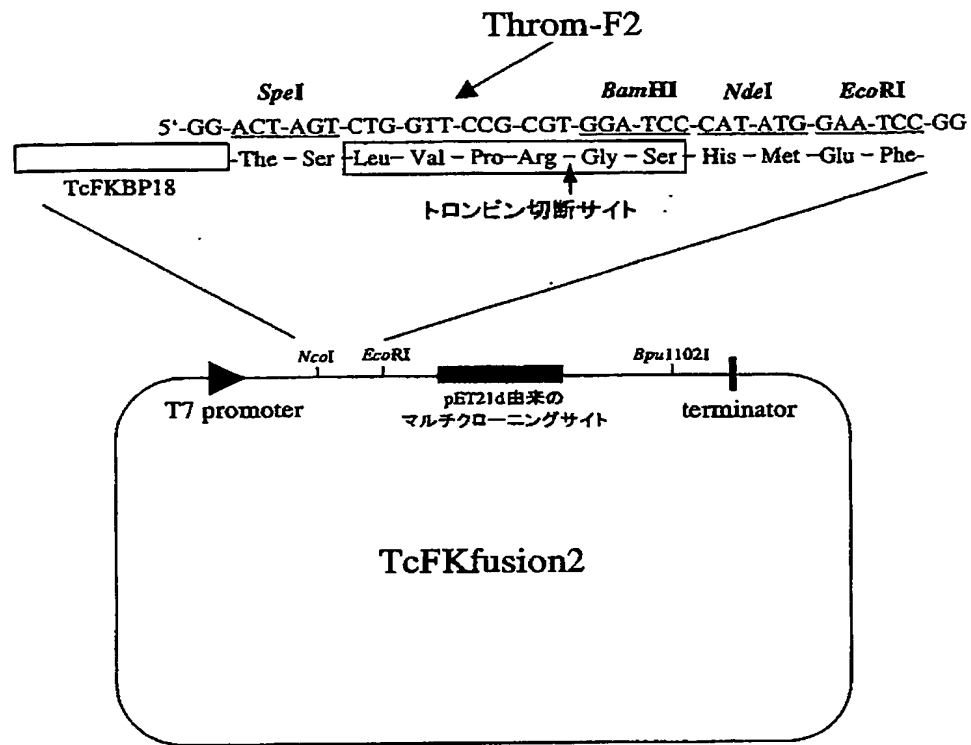
精製したマウス由来 anti-HEL scFv-TcFKBP18 融合タンパク質と、それをトロンビン処理した結果を示す図である。

【図 8】

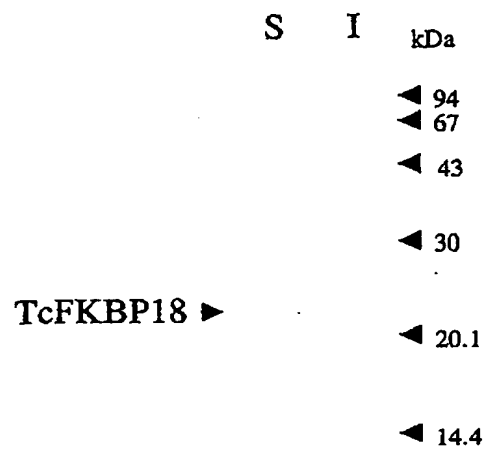
発現の結果得られたマウス由来 anti-HEL scFv の活性を ELISA 法により示した図である。

【書類名】 図面

【図 1】

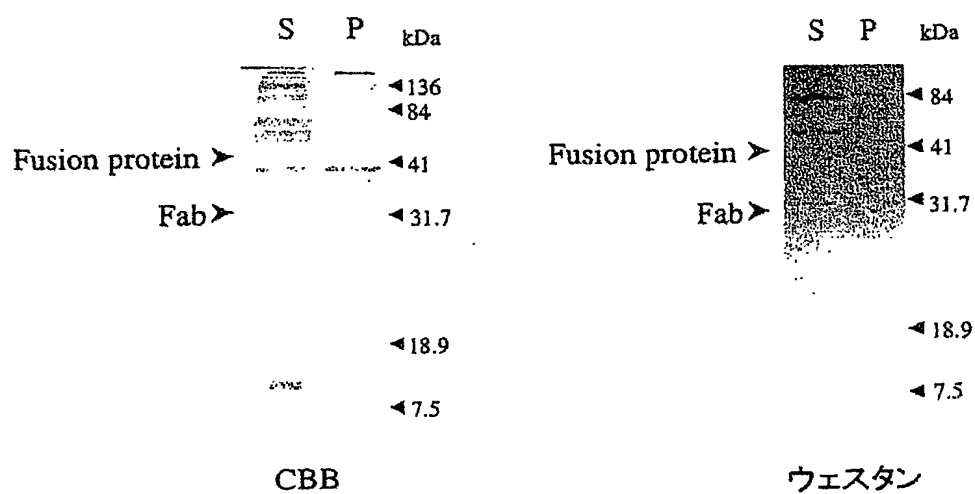


【図 2】

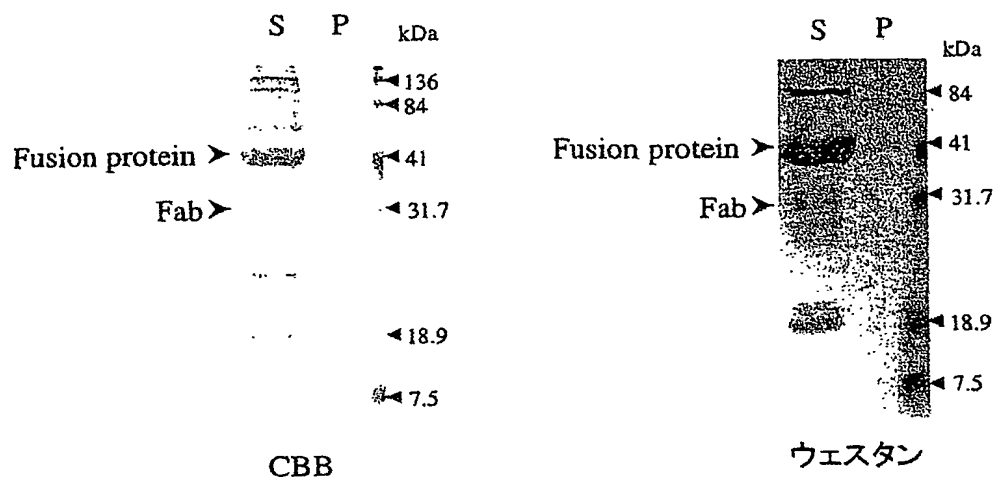


S: 可溶画分
I: 封入体画分

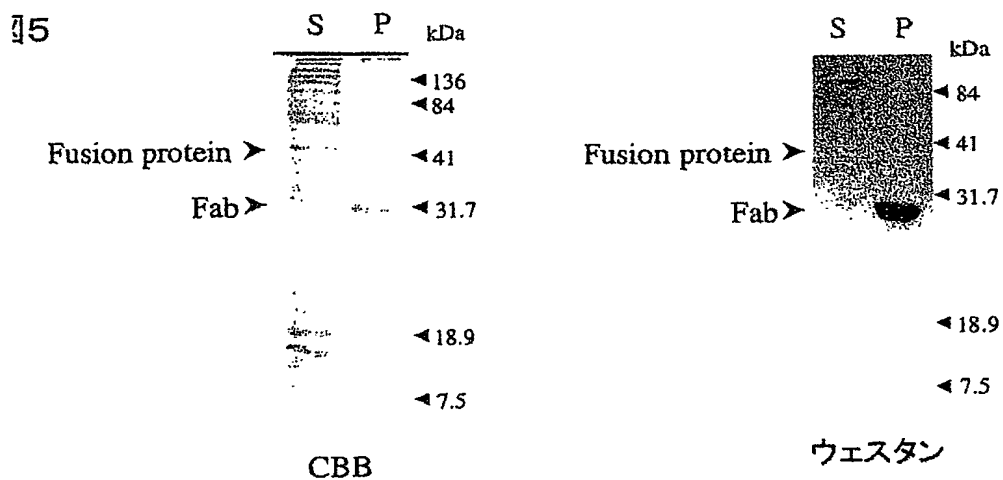
【図 3】



【図 4】

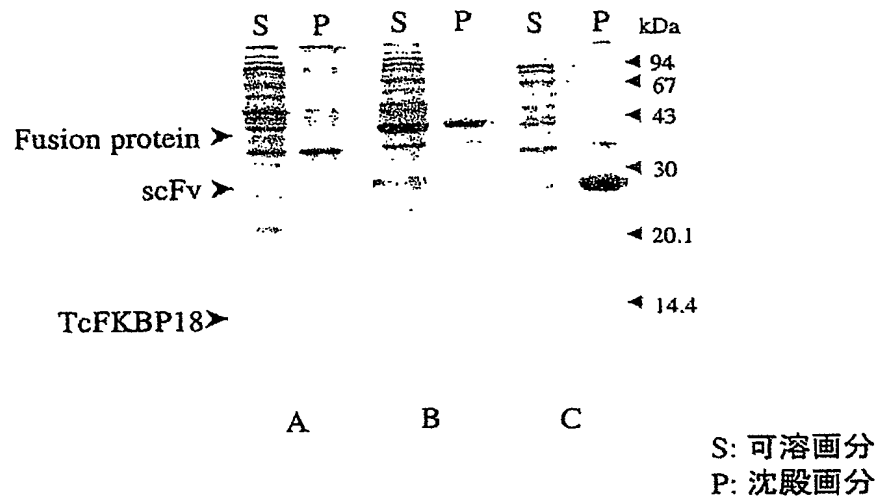


【図 5】

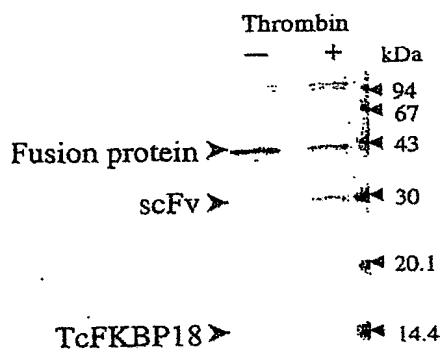


S: 可溶画分
P: 沈殿画分

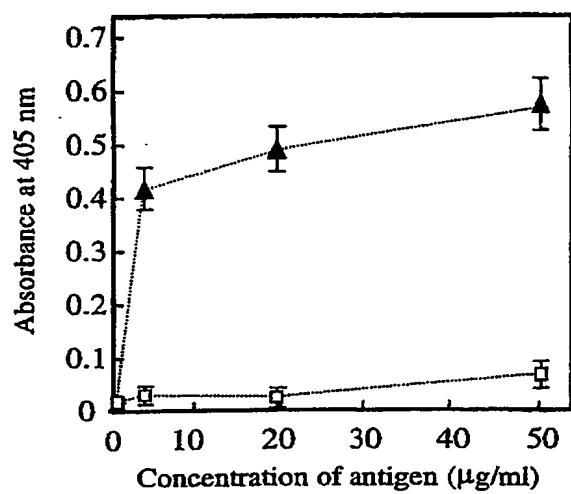
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 組み換えタンパク質が異常型として発現することを防ぎ、天然型として可溶画分に生産することができる発現ベクターを提供する。

【解決手段】 第2コード領域を組み込んで発現させることにより、第1コード領域にコードされるタンパク質と第2コード領域にコードされるタンパク質との融合タンパク質が得られる発現ベクターであって、(a) 分子シャペロン活性を有するポリペプチドをコードし、プロモーターに有効に連結する第1コード領域、

(b) 第1コード領域と同じ解読枠内であって、第1コード領域の下流にあり、第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域、及び、(c) 第1コード領域と第2コード領域を挿入することができる少なくとも1つの制限酵素サイトを有する領域との間にあり、同じ解読枠内で翻訳されてプロテアーゼ消化アミノ酸配列となる領域からなる発現ベクター。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-185020
受付番号	50200929020
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成14年 6月26日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 6月25日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-185020

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[591001949]

1. 変更年月日

1995年 6月 7日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都文京区本郷1丁目28番10号

氏 名

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所

2. 変更年月日

2003年 4月23日

[変更理由]

住所変更

住 所

岩手県釜石市平田第3地割75番1号

氏 名

株式会社海洋バイオテクノロジー研究所

特願 2002-185020

出願人履歴情報

識別番号

[000002174]

1. 変更年月日

1990年 8月29日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号

氏 名

積水化学工業株式会社